

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDA PINHELLI

AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DO GENE *draB* de *Azospirillum brasilense*



CURITIBA,

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDA PINHELLI

AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DO GENE *draB* de *Azospirillum brasilense*

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Vivian Rotuno Moure

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular

CURITIBA,

2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por seu cuidado e amor;

Ao Professor Emanuel Maltempi de Souza, pela orientação, por ter me aceitado como aluna e por todos os aprendizados;

Aos meus co-orientadores durante os anos de Iniciação Científica e Monografia, Dr. Marco Aurélio Schüller de Oliveira, Dra. Vivian Rotuno Moure e Msc. Adriano Alves Stefanello, que me ensinaram muitas coisas sobre laboratório e experimentos, sempre muito pacientes, com bom ânimo e cheios de bons conselhos;

Aos meus colegas de laboratório 279, Cícero, Luís Paulo, Manuel, Maritza, Marina, Silvia, Alejandra e Malu, pela amizade e por terem tornado o trabalho mais fácil;

A Helba, Adrian, Edileusa e Professor Luciano, que me ajudaram com as análises de Bioinformática;

Aos técnicos Dona Rose, Bruna e Valter, pela dedicação e toda ajuda;

A todos do departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, em especial a todo grupo de Fixação Biológica de Nitrogênio;

Aos meus mais estimados amigos que conquistei durante a graduação, Lucas, Luana, Carol, Mc, Mariana, Rafael, Renata, Tabata e Jaque, que tornaram tudo mais divertido;

À minha família, Mãe, Pai, Bi, Felipe e Jorginho, que sempre me regaram com muito amor e me tornaram uma pessoa melhor.

Ao Fábio, meu namorado, amigo e companheiro, por todas as dicas durante as disciplinas, pelas conversas, pela paciência, ajudas com a monografia, e principalmente por ter tornado minha vida mais feliz desde que chegou.

RESUMO

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é o processo de conversão do nitrogênio gasoso em amônio, forma metabolicamente utilizável pela maioria dos organismos. Esse processo é realizado por procariotos diazotróficos, que podem ser de vida livre, associativos ou simbiontes. A reação de conversão de N_2 a NH_3 é realizada por um complexo enzimático chamado de nitrogenase. A nitrogenase é composta por duas proteínas: A dinitrogenase redutase, também chamada de proteína Fe ou NifH, e a dinitrogenase, também chamada de proteína Fe-Mo ou NifDK. A proteína Fe é doadora de elétrons para a proteína Fe-Mo, que contém o sítio ativo da enzima. A reação realizada por este complexo enzimático demanda um alto gasto de ATP e como consequência é um processo finamente regulado. Dentre os mecanismos de regulação da FBN, a inativação da proteína Fe por ADP-ribosilação foi descrita em *R. rubrum* e *A. brasilense*. Em resposta à adição de íons amônio ou condições anaeróbicas, a proteína DraT catalisa a transferência de uma ADP-ribose, oriunda de uma molécula de NAD^+ , para o resíduo Arg-101 da proteína Fe, tornando-a inativa e abolindo, portanto, a atividade de nitrogenase. Em resposta à falta de íons amônio e a condições microaerófilas, a proteína DraG remove a ADP-ribose da proteína Fe, restaurando a atividade de nitrogenase. O gene *draB* aparece a jusante de *draTG* em *Rhodospirillum rubrum* formando um operon. Este operon foi identificado também em *A. brasilense*. DraB possui alta similaridade com NifO de *Azotobacter vinelandii*, que está envolvido no metabolismo de molibdênio, e ArsC de *Escherichia coli*, uma arsenato redutase responsável pela redução de arsenato a arsenito. Em *R. rubrum* uma mutação em *draB* causou uma diminuição na atividade de DraG, sugerindo que *draB* pode estar envolvida na regulação da nitrogenase. Sendo assim, o objetivo desse trabalho é a clonagem do gene *draB* de *A. brasilense* em vetor de expressão pET28a, superexpressão em *E. coli* BL21 (DE3) e purificação de DraB. *draB* foi amplificado por PCR a partir do DNA genômico de *A. brasilense* sp245 e inúmeras tentativas de clonagem em vetor de expressão pET28a foram realizadas mas ainda não foi possível obter os plasmídeos recombinantes.

Palavras-chave: ADP-ribosilação, *draB*, nitrogenase.

ABSTRACT

Biological nitrogen fixation is a process of converting nitrogen gas into ammonium, which in turn is metabolically usable by most organisms. This process is carried out through the symbiosis between plants and diazotrophic organisms, such as *Azospirillum brasilense*. The conversion of N_2 to NH_3 is carried out by an enzymatic complex called nitrogenase. Nitrogenase is composed of two proteins: dinitrogenase reductase, also known as the Fe protein or NifH, and dinitrogenase, also called Fe-Mo protein or NifDK. The Fe protein is an electron donor for the Fe-Mo protein, which contains the active site of the enzyme. The reaction catalyzed by this enzymatic complex demands a high cost of ATP and consequently must be finely regulated. The gene *draB* appears downstream of *draTG* in *Rhodospirillum rubrum* forming an operon. This operon was also identified in *A. brasilense*. The products of the *draT* and *draG* genes are involved in post-translational regulation of the Fe protein by ADP-ribosylation. In response to the addition of ions ammonium or anaerobic conditions, DraT catalyzes the transfer of an ADP-ribose, from a NAD^+ , to the Arg-101 residue of the Fe protein, making it inactive and thus abolishing nitrogenase activity. DraG removes an ADP-ribose from the protein Fe, restoring a nitrogenase activity. DraB has high similarity with NifO from *Azotobacter vinelandii*, which is involved in molybdenum metabolism, and ArsC from *Escherichia coli*, an arsenate reductase responsible for the reduction of arsenate to arsenite. In *R. rubrum* a mutation in *draB* caused a decrease of DraG activity, suggesting that *draB* may be involved in the regulation of nitrogenase. Therefore, the objective of this work is to clone the *A. brasilense draB* gene with optimized codons in expression vector pET28a, expression in *E. coli* BL21 (DE3) and purification of DraB. *draB* was amplified by PCR from *A. brasilense* sp245 genomic DNA and despite numerous attempts at cloning into expression vector pET28a, the recombinant plasmids were not yet obtained.

Key-words: ADP-ribosylation, *draB*, nitrogenase.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- MODELO ESTRUTURAL DO COMPLEXO NITROGENASE DE <i>Azotobacter vinelandii</i>	15
FIGURA 2- REAÇÃO DE REDUÇÃO DE N ₂ A NH ₃ CATALISADA PELA NITROGENASE.....	15
FIGURA 3- DISPOSIÇÃO GENÔMICA DOS OPERONS <i>nifHDK</i> E <i>draTGB</i> EM <i>Azospirillum brasilense</i>	20
FIGURA 4- ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIA DO GENE QUE CODIFICA A PROTEÍNA DraB DE <i>A. brasilense</i> ESTIRPES FP2 E SP245.....	28
FIGURA 5- ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS QUE CORRESPONDEM A PROTEÍNA DraB DE <i>A. brasilense</i> ESTIRPES FP2 E SP245.....	28
FIGURA 6- PREDIÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DE DRAB UTILIZANDO OS SERVIDORES PHYRE2 E PYMOL.....	29
FIGURA 7- MODELO DE ESTRUTURA TERCIÁRIA DE DRAB INDICANDO O RESÍDUO CATALÍTICO CYS-12.....	30
FIGURA 8- SOBREPOSIÇÃO DAS ESTRUTURAS TRIDIMENSIONAIS DE DRAB DE <i>A. brasilense</i> FP2 E SP245.....	31
FIGURA 9-PCR DO GENE <i>DRAB</i> A PARTIR NO GENOMA DE <i>A. BRASILENSE</i> FP2.....	32
FIGURA 10- PCR DO GENE DRAB A PARTIR NO GENOMA DE <i>A. brasilense</i> SP245.....	32
FIGURA 11- EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL.....	33

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- (A) COMPOSIÇÃO DO MEIO NFBHP; (B) MISTURA DE FOSFATOS PARA <i>Azospirillum brasilense</i>	22
TABELA 2- SEQUÊNCIAS DOS PRIMERS UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DE DraB.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP – 5' difosfato de adenosina

AmtB - transportador de amônia transmembrana

ATP - 5' tri fosfato de adenosina

BPCP - bactérias promotoras de crescimento em plantas

D.O. – densidade óptica

DraG – dinitrogenase redutase glicohidrolase

DraT – dinitrogenase ADP-ribosiltransferase

EDTA – ácido etilenodiamino-tetracético

GDH- Glutamato desidrogenase

GOGAT- Glutamato sintetase GS- Glutamina sintase

NADP⁺- nicotinamida- adenina dinucleotídeo fosfato oxidado

NADPH- nicotinamida- adenina dinucleotídeo fosfato reduzido

NAD⁺ - nicotinamida-adenina dinucleotídeo oxidado

NADH – nicotinamida- adenina dinucleotídeo reduzido

PCR- reação em cadeia da polimerase

Tris- tris (hidroximetil)- aminometano

2-OG – 2-oxoglutarato (α - cetoglutarato)

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
OBJETIVOS	12
Objetivos gerais	12
Objetivos específicos	12
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
Bactérias promotoras de crescimento em plantas	13
<i>Azospirillum</i>	13
Nitrogenase e o processos de fixação biológica de nitrogênio	14
Captação de amônio	16
Assimilação de amônio	16
Proteínas PII	17
Regulação pós-traducional da nitrogenase por ADP-ribosilação	18
DraB	19
MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
Microrganismos e vetores	21
Antibióticos.....	21
Meios de cultivo	21
Reagentes e material de consumo.....	22
Gene <i>draB</i>	23
Preparo de células quimiocompetentes e transformação bacteriana.....	23
Extração de DNA plasmidial	24
Desenho de oligonucleotídeos iniciadores (primers)	24
Obtenção e análise de sequências	25
Predição por homologia da estrutura terciária de DraB	25
Amplificação do gene <i>draB</i>	25

Clonagem.....	26
Eletroforese de DNA	26
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
Análise de sequências	27
Predição por homologia da estrutura terciária de DraB	29
Amplificação do gene <i>draB</i>	31
Clonagem.....	33
CONCLUSÃO.....	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

1. INTRODUÇÃO

O ciclo do nitrogênio é um dos ciclos mais importantes nos ecossistemas terrestres, pois o nitrogênio compõe biomoléculas essenciais como proteínas, ácidos nucleicos e clorofila, sendo assim um fator limitante para produtividade primária local (GRUBER E GALLOWAY, 2008). Esse elemento é abundante na atmosfera na forma molecular (N_2), que é pouco reativa e não pode ser metabolizada por nenhum eucarioto e pela maioria dos procariotos. Apenas alguns procariotos, denominados diazotróficos, são capazes de realizar a conversão do nitrogênio molecular (N_2) a amônio (NH_3), uma molécula facilmente assimilável. A capacidade de fixar nitrogênio é distribuída em diversos grupos pouco relacionados como sulfobactérias verdes, firmibacterias, actinomicetos, cianobactérias e proteobactérias, enquanto que em eucariontes essa capacidade não foi relatada (RAYMOND et al., 2004).

Os organismos diazotróficos podem ser de vida livre, associativos e simbiontes. Quando associados às plantas, além da fixação biológica de nitrogênio, essas bactérias podem promover o crescimento vegetal pela produção de substâncias que auxiliam o crescimento radicular, sendo então consideradas bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCP) (DIXON E KAHN, 2004; MOREIRA et al, 2010), algumas espécies ainda podem ser fitopatógenas, como *H. rubrisubalbicans* causadora da doença estria mosqueada em uma variedade de cana-de-açúcar (OLIVARES et al., 1997).

Em áreas não degradadas, com vegetação clímax, a ciclagem de nutrientes é eficiente e garante a manutenção do metabolismo e da taxa de crescimento vegetal; por outro lado, em áreas degradadas, com substratos pobres, a fixação biológica de nitrogênio deve ser estimulada, uma vez que a disponibilidade de nitrogênio fixado pode ser um fator limitante para a produtividade agrícola (MOREIRA et al, 2010). Além disso, a administração de fertilizantes nitrogenados é um dos processos mais caros na agricultura e ainda contribuem para a lixiviação, degradação de cursos da água e liberação de gases que contribuem para o aquecimento global (DIXON E KAHN, 2004). A exploração e utilização de nitrogênio fixado em sistemas agrícolas tem

aumentando globalmente; por exemplo, países como Argentina e Brasil dobraram as áreas de soja cultivadas entre 2000 e 2005 utilizando o modelo de rotação de culturas com leguminosas (HERRIDGE *et al*, 2008). Com o aumento da população e da demanda por alimentos, a necessidade de nitrogênio fixado em sistemas agrícolas aumentará (CANFIELD *et al*, 2010). Nesse contexto, fica clara a necessidade de pesquisas que busquem compreender melhor os diversos processos metabólicos envolvidos na fixação de nitrogênio em solos, com vistas a melhorar a eficiência do uso de nitrogênio.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

O objetivo geral deste trabalho é a clonagem, superexpressão e purificação da proteína DraB.

2.2. Objetivos específicos

- a) Análise e anotação das sequências do gene *draB* de *A.brasilense* estirpe FP2 e sp245;
- b) Modelagem da estrutura tridimensional por homologia de aminoácidos da proteína DraB;
- c) Amplificação do gene *draB*;
- d) Clonagem de *draB* no vetor de expressão pET28a;
- e) Superexpressão de DraB em diferentes estirpes de *E.coli*.
- f) Purificação de DraB por cromatografia de afinidade.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Bactérias promotoras de crescimento em plantas

Bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCP) são bactérias que colonizam a rizosfera ou o xilema de plantas e promovem benefícios por diversos mecanismos que incluem supressão de patógenos (SIDDIQUI, 2006), disponibilização de nutrientes para as plantas (ORHAN *et al.*, 2006), e produção de fitormônios (ASGHAR *et al.*, 2002). Bactérias fixadoras de nitrogênio podem estabelecer simbiose (*Rhizobium sp.* e *Frankia sp.*) ou associação endofítica (*Herbaspirillum sp.* e *Gluconacetobacter sp.*) e epifítica (*Azospirillum brasilense*) com raízes de plantas promovendo a assimilação de nitrato ou amônia, que são utilizados como fonte de nitrogênio pelo vegetal (PÉREZ- MONTAÑO *et al.*, 2013).

3.1.1. *Azospirillum*

O gênero *Azospirillum* foi descrito por Tarrand *et al.*, 1978, como bactérias diazotróficas, gram-negativas, que em meio líquido possuem um único flagelo polar para locomoção, e em meio sólido apresentam inúmeros flagelos laterais além do flagelo polar. Possuem metabolismo respiratório aeróbico e algumas habilidades fermentativas, e crescem bem na presença malato, succinato, piruvato ou lactato como fonte de carbono. O gênero pertence à subdivisão alfa das proteobactérias e comporta 19 espécies (<http://www.bacterio.net/azospirillum.html>), entre elas *Azospirillum lipoferum* (TARRAND *et al.*, 1978), *Azospirillum brasilense* (TARRAND *et al.*, 1978), *Azospirillum amazonense* (MAGALHAES *et al.*, 1981) *Azospirillum halopraeferens* (REINHOLD *et al.*, 1978) e *Azospirillum irakense* (KHAMMAS *et al.*, 1989). Bactérias do gênero *Azospirillum* habitam principalmente a rizosfera, onde colonizam a superfície radicular; algumas estirpes são capazes de colonização endofítica. Por exemplo, *A. brasilense* sp245 é capaz de entrar no interior das células ciliadas da raiz do trigo, enquanto a estirpe *A. brasilense* Sp7 é restrita ao solo da rizosfera, principalmente a zona ciliada da raiz (STEENHOUDT E VANDERLEYDEN, 2000).

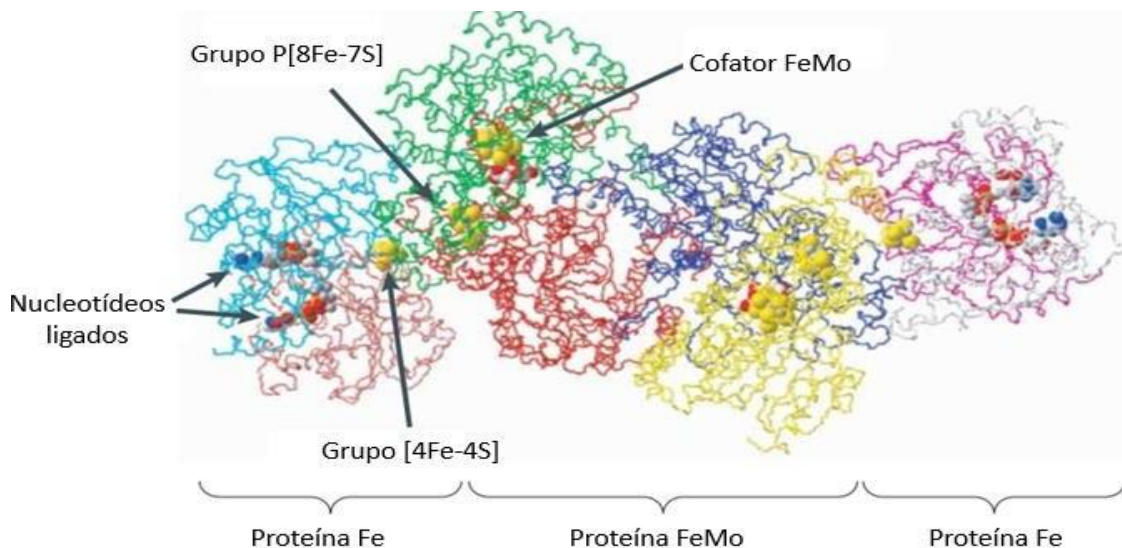
Sob determinadas condições ambientais, bactérias desse gênero são capazes de fixar nitrogênio e de produzir auxinas, favorecendo o crescimento de

raízes com o aumento da superfície radicular, a absorção de nutrientes e água se torna mais eficiente, favorecendo assim o crescimento da planta (STEENHOUDT E VANDERLEYDEN, 2000). As propriedades de promoção de crescimento vegetal de *A. brasilense* tornaram-no atrativo para indústria biotecnológica, visto que fertilizantes nitrogenados são de alto valor agregado, com preço médio no mercado nacional de US\$ 1 por kg de nitrogênio (HUNGRIA, 2011). Sabendo disso, o uso de bactérias promotoras do crescimento de plantas como inoculantes em culturas, se mostra como uma alternativa viável e benéfica tanto no âmbito econômico como no ambiental. Estima-se que o uso de inoculantes contendo estirpes selecionadas de *A. brasilense* pode resultar em uma economia de US\$ 2 bilhões por ano (HUNGRIA, 2011).

3.2. Nitrogenase e o processos de fixação biológica de nitrogênio

O complexo enzimático da nitrogenase é responsável pela fixação biológica de nitrogênio e é composto por duas proteínas: a dinitrogenase redutase (proteína Fe ou NifH), produto do gene *nifH*, e a dinitrogenase (proteína Fe-Mo ou NifDK), produto do gene *nifDK*. A proteína Fe é um dímero γ_2 e contém um núcleo 4Fe-4S, enquanto a proteína Fe-Mo é um tetrâmero $\alpha_2\beta_2$, com dois grupos prostéticos: 2 centros P e 2 cofatores ferro molibdênio (FeMo). A nitrogenase é sensível ao oxigênio devido a estes grupos metálicos presentes em sua estrutura nativa (FIGURA 1) (DIXON & KHAN, 2004).

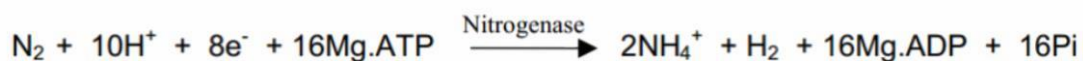
FIGURA 1-MODELO ESTRUTURAL DO COMPLEXO NITROGENASE DE *Azotobacter vinelandii*. As subunidades dos dois dímeros de proteína Fe estão coloridas em ciano, marrom, magenta e cinza. As subunidades α da proteína FeMo estão coloridas em verde e amarelo, e as subunidades β em vermelho e azul. As setas estão indicando grupos metálicos sensíveis ao oxigênio e os nucleotídeos ligados.



Fonte: Adaptado de DIXON E KHAN (2004).

A reação de redução de dinitrogênio gasoso a amônio (FIGURA 2), catalisada pela nitrogenase, se inicia quando a proteína Fe é reduzida por ferredoxina ou flavodoxina, e liga-se a MgATP, provocando uma diminuição no seu potencial redução em aproximadamente -120mV para cerca de -400mV (LANZILOTTA *et al.*, 1997). Essa redução no potencial propicia a transferência de elétrons da proteína Fe para a proteína Fe-Mo, que possui o sítio ativo da enzima (BURRIS, 1991). A transferência de elétrons está associada à hidrólise de MgATP para MgADP e Pi, sendo que ADP inibe a reação, portanto deve ser substituído novamente a ATP. Esta enzima catalisa a redução de outros substratos como cianeto, metilisocianeto, azida, acetileno, ciclopropeno e diazirina. A reação demanda um alto gasto de ATP, e consequentemente é um processo finamente regulado (BURRIS, 1991; DIXON e KHAN, 2004).

FIGURA 2-- REAÇÃO DE REDUÇÃO DE N_2 A NH_3 CATALISADA PELA NITROGENASE.



Fonte:(BURRIS, 1991).

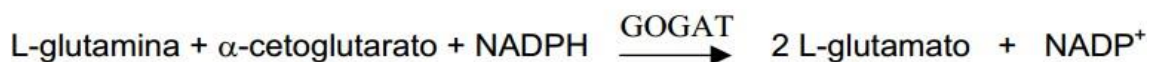
3.3. Captação de amônio

As membranas bacterianas são altamente permeáveis a NH_3 e a difusão pode ocorrer nos dois sentidos. Essa difusão não é controlada e é muito lenta em pH baixo ou neutro. Quando os níveis de amônio extracelular estão altos, a passagem de amônio através da membrana se dá em resposta ao gradiente de concentração, podendo suprir o metabolismo celular. Por outro lado, quando a concentração de amônio extracelular está baixa, surge a necessidade de proteínas transportadoras de NH_4^+ (KLEINER, 1985).

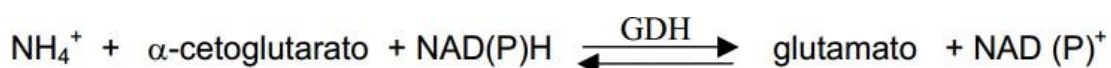
A família de proteínas transportadoras de amônio (Amt) é encontrada em bactérias, arqueias, fungos, plantas e animais. As proteínas Amt possuem um núcleo conservado de 11 hélices transmembranas e C terminal intracelular, formando um canal hidrofóbico pelo qual as moléculas de amônia passam. Normalmente a proteína possui 400-450 resíduos de aminoácidos, e em alguns casos a região C terminal pode ser estendida (JAVELLE *et al.*, 2004). Em *E. coli*, o principal canal de amônia é a proteína AmtB, um trímero estável, cujo gene está presente no operon *glnK amtB*. Em altas concentrações de amônio este operon é pouco transcrito, enquanto que quando a concentração de amônio diminui, a expressão do operon é induzida (JAVELLE *et al.*, 2005). O transportador AmtB apresenta grande afinidade por amônio que, quando se liga ao canal de entrada da proteína, é desprotonado a amônia devido à entrada em um canal que reduz pKa para <6. Ao atingir o meio intracelular, a amônia, é reprotonada a amônio (KHADEMI *et al.*, 2004).

3.4. Assimilação de amônio

Ao atingir o meio intracelular, o amônio é convertido em glutamato e glutamina, que por sua vez servem como doadores de nitrogênio para reações biossintéticas. Existem duas vias principais de assimilação; uma delas envolve a ação sequencial das enzimas glutamina sintetase e glutamato sintetase (GS-GOGAT), que produzem glutamato a partir a amônia e 2- oxoglutarato (MERRICK e EDWARDS, 1995):



A outra via de assimilação é realizada através da enzima glutamato desidrogenase (GDH), que catalisa uma aminação redutora de 2-oxoglutarato por amônia que resulta em glutamato, em uma reação que depende de NADPH (MERRICK e EDWARD, 1995):



Na maioria das bactérias, a via GS-GOGAT é utilizada principalmente em condições limitantes de amônia, uma vez que a via GDH é ineficaz nestas condições devido ao K_m relativamente alto da enzima (cerca de 1 mM) (MERRICK e EDWARDS, 1995). Em *A. brasilense* as atividades de GOGAT e GS são diminuídas quando as células são cultivadas em meio contendo NH_4^+ , enquanto a atividade de GDH é aumentada (WESTBY *et al.*, 1987).

3.5. Proteínas PII

As proteínas PII são amplamente distribuídas nos seres vivos e possuem representantes tanto em eucariontes quanto em procariontes. Em Bacteria e Archaea, essas proteínas participam da integração de sinais dos níveis intracelulares de carbono e nitrogênio; a detecção desses sinais fornece a informação necessária para controlar a assimilação de nitrogênio (NINFA e ATKINSON, 2000). As proteínas PII são homotriméricas; em proteobactérias, cada monômero possui 112 aminoácidos e três loops importantes: loop-T (37-55), loop-B (82-88) e loop-C (102-105), sendo esta estrutura bastante conservada. Os B e C-loops formam o sítio de ligação a efetores e estão localizados entre dois monômeros adjacentes. O T-loop é uma estrutura grande e móvel responsável pela maioria das interações com PII já estudadas, isso porque as proteínas podem ser covalentemente modificadas por uridilação no resíduo tirosina 51 localizado no loop-T de cada monômero (CARR *et al.*, 1996). As PII podem ser divididas em três subfamílias: GlnB, GlnK e Nifl (FORCHHAMMER, 2008).

A função das proteínas PII depende de mudanças conformacionais geradas por sua ligação a moléculas efetoras como ATP, ADP e 2-oxoglutarato (2-OG) e de modificações pós-traducionais (NINFA e JIANG, 2005; MERRICK,

2015). Nas proteobactérias, as PII são uridiladas por atividade de uma uridililtransferase (GlnD), em resposta aos níveis de glutamina intracelular. Quando a concentração de glutamina é alta, as PII são desuridiladas, e em baixas concentrações de glutamina as proteínas PII são uridiladas. Dependendo do estado de uridilação de PII e dos níveis intracelulares de ATP, ADP e 2-OG, as proteínas PII podem interagir com diferentes proteínas-alvo, regulando os metabolismos de carbono e nitrogênio. Por exemplo, proteínas PII não-uridiladas podem formar um complexo com AmtB na membrana, bloqueando fluxo de amônia através do transportador (HUERGO *et al.*, 2012).

Em *Azospirillum brasilense*, o gene *glnB* foi identificado a montante do gene estrutural *glnA*, que codifica para a glutamina sintetase (GS) e é expresso constitutivamente (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1990). Em 1996, De Zamaroczy *et al* encontraram uma proteína, denominada GlnZ, que possui 67% de identidade com a GlnB de *A. brasilense*. Em outros organismos, como *Herbaspirillum seropedicae* e *E.coli*, além de GlnB, GlnK, um parálogo de GlnZ é produzida. No entanto, enquanto *glnK* é co-transcrito com *amtB*, *glnZ* não (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1996; HUERGO *et al.*, 2007). As proteínas GlnB e GlnZ estão envolvidas no mecanismo de inativação reversível da nitrogenase por ADP-ribosilação. A proteína GlnB detecta o rápido aumento da concentração de amônio, enquanto GlnZ é responsável por sinalizar a diminuição dessa concentração (KLASSEN *et al.*, 2005).

3.6. Regulação pós-traducional da nitrogenase por ADP-ribosilação

A. brasilense possui um mecanismo de regulação pós- traducional da nitrogenase controlado por duas enzimas: dinitrogenase redutase ADP-ribosiltransferase (DraT) e dinitrogenase redutase glicohidrolase (DraG). Este sistema também está presente em *Rhodospirillum rubrum* (LIANG *et al.*, 1991). DraT é um monômero de aproximadamente 30 kDa, que catalisa a transferência de um ADP-ribosil, oriundo de um NAD⁺, para um resíduo conservado de arginina (Arg- 101) de uma das subunidades da proteína Fe. Com isso, a proteína Fe torna-se inativa e a atividade da nitrogenase é inibida (LOWERY e LUDDEN, 1989; HUERGO *et al.*, 2005). DraG é um monômero de aproximadamente 32 kDa, cuja a função é a remoção do grupo ADP- ribosil do resíduo Arg-101 da proteína Fe, promovendo a reativação da nitrogenase (SAARI *et al.*, 1984; HUERGO *et*

al., 2005).

As atividades de DraT e DraG são reguladas em resposta a sinais de amônia e energia (microaerofilia/anaerobiose para *A. brasilense* e luz/escuro para *R. rubrum*). Na presença de amônio extracelular ou depleção de energia (anaerobiose para organotróficos como *A. brasilense* ou escuro para fototróficos como *R. rubrum*), DraT inativa a proteína Fe através da adição de uma ADP-ribose ao resíduo Arg-101. Em resposta a falta de íons amônio, condições microaerófilas ou presença de luz, a proteína DraG remove a ADP-ribose por modificação covalente na estrutura da proteína Fe, tornando a nitrogenase ativa (ZHANG *et al.*, 1997; MOURE *et al.*, 2014).

Em *A. brasilense*, as proteínas da família PII (GlnB e GlnZ) estão diretamente envolvidas no sistema de regulação DraT/DraG. Em condições de fixação de nitrogênio, a concentração de glutamina intracelular é baixa e a de 2-OG é alta. GlnB e GlnZ são uridililados pela ação da enzima GlnD e ligados a MgATP e 2-OG. Dessa forma as proteínas PII não interagem com DraT e DraG, portanto a DraT está inativa, enquanto DraG permanece ativa (HUERGO *et al.*, 2009). Quando os níveis de amônio e glutamina aumentam e os níveis de 2-OG diminuem, as proteínas PII são desuridililadas e tornam-se capazes de interagir com DraT e DraG (HUERGO *et al.*, 2009). GlnB interage com DraT resultando em modificações conformacionais que tornam a enzima ativa para realizar a transferência de um grupo ADP-ribosil para proteína Fe (MOURE *et al.*, 2013). GlnZ interage com DraG formando o complexo GlnZ-DraG, que é direcionado para membrana. Esse complexo se liga à AmtB, formando um ternário GlnZ-DraG- AmtB. A formação desse complexo ternário resulta na inativação de DraG, além de bloquear o transporte de amônio através do transportador AmtB (HUERGO *et al.*, 2006; 2009; MOURE *et al.*, 2014).

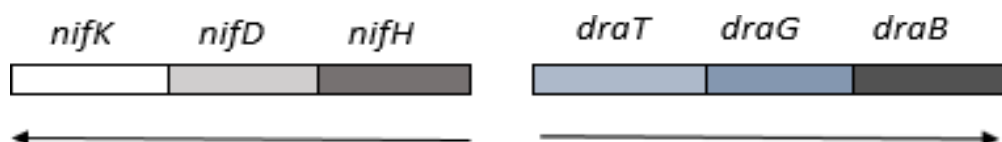
3.7. DraB

Em *Azospirillum brasilense* os genes que codificam DraT (*draT*), DraG (*draG*) e DraB (*draB*) são transcritos juntos no mesmo operon, sendo que *draB* está localizado a jusante de *draG* (FIGURA 3) (ZHANG *et al.*, 1992). Análises *in silico* utilizando o software ProClaT, revelaram que o gene *draB* de *A. brasilense* codifica para uma proteína semelhante a NifO; análises de co-ocorrência entre *NifO* e *draB* levaram à observação de coeficiente de correlação entre os dois genes

(RUBEL *et al.*, 2016). Em *A. vinelandii*, o gene *nifO* codifica para uma proteína envolvida no metabolismo de molibdênio. *draB* também possui uma alta similaridade com *arsC* de *E. coli*, que codifica para uma arsenato redutase, que catalisa a redução de arsenato a arsenito (RUBEL *et al.*, 2016).

Devido a sua localização no operon *draTG*, supõe-se que DraB desempenhe algum papel na atividade das proteínas que regulam a nitrogenase. No entanto, a função do produto do gene *draB* de *Azospirillum brasilense* não foi elucidada até o momento (RUBEL *et al.*, 2016). Há evidências de que a proteína DraB de *R. rubrum* pode regular a atividade de DraG. Liang *et al.* (1991) construíram mutantes com a deleção de *draB* e compararam com estirpes contendo *draTGB*. A mutação de *draB* resultou em um fenótipo fraco, inativando a proteína Fe mais rapidamente e reativando-a mais lentamente. Não houve mudança na atividade de DraT, todavia, os níveis de DraG foram menores nas estirpes mutantes em comparação com as selvagens (LIANG *et al.*, 1991). Zhang *et al.* (2001), utilizou o plasmídeo pCH7 contendo *draTG* retirado de *R. rubrum* para transformar em diferentes estirpes de *K. pneumoniae*. A atividade da nitrogenase foi avaliada em resposta a adição de íons amônio comparando as estirpes que possuem *draTG* e *draTGB*. Não foram observadas diferenças significativas na atividade da nitrogenase e possivelmente, *draB* não possui efeito sobre a regulação da DraG realizada por GlnK e as demais proteínas PII (ZHANG *et al.*, 2001; LIANG *et al.*, 1991).

FIGURA 3- DISPOSIÇÃO GENÔMICA DOS OPERONS *NifHD* e *draTGB* EM *Azospirillum brasilense*.



4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Microrganismos e vetores

Os vetores pBluescript II KS (+) e pET28a foram utilizados para captura do produto de PCR e construção do plasmídeo para expressão de DraB, respectivamente. *Escherichia coli* TOP10 (SAMBROOK *et al.*, 1989) foi empregada para os procedimentos de clonagem. As estirpes FP2 (estirpe derivada de SP7) (PEDROSA; YATES, 1984) e sp245 de *A. brasilense* foram utilizadas como fonte do gene *draB*.

4.2. Antibióticos

Os antibióticos utilizados para crescimento, manutenção e seleção das estirpes de *E. coli* contendo plasmídeos foram canamicina 50 µg/mL (pET28a) e ampicilina 250 µg/mL (pBluescript II KS (+)). Os antibióticos utilizados para crescimento, manutenção das estirpes de *Azospirillum brasilense* FP2 foram Ácido Nalidíxico 10 µg/mL e Neo Sulmetina 100 µg/mL.

4.3. Meios de cultivo

O meio de cultivo utilizado para o crescimento de *E. coli* foi o meio Luria Bertani (LB - Triptona 10g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 10 g/L). Para o cultivo em meio sólido, o meio LB foi acrescido de ágar 1,5% (m/v), passando a ser denominado LA.

O meio de cultivo para crescimento das estirpes de *A. brasilense* utilizado foi o meio NFbHPN lactato (MACHADO *et al.*, 1991) e sua composição está descrita na TABELA 1.

TABELA 1- (A) COMPOSIÇÃO DO MEIO NFBHP; (B) MISTURA DE FOSFATOS PARA *Azospirillum brasilense*.

A.

Reagentes	Gramas/ litro
KH_2PO_4	4,0
K_2HPO_4	6,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$2,0 \cdot 10^{-1}$
NaCl	$1,0 \cdot 10^{-1}$
CaCl_2	$2,0 \cdot 10^{-2}$
Ácido nitrilotriacético	$5,6 \cdot 10^{-2}$
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$2,0 \cdot 10^{-2}$
Lactato de sódio	5,0
Biotina	$1,0 \cdot 10^{-4}$
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$2,0 \cdot 10^{-3}$
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$2,35 \times 10^{-3}$
H_3BO_3	$2,8 \cdot 10^{-3}$
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$8,0 \cdot 10^{-5}$
$\text{ZnSO}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$2,4 \cdot 10^{-4}$

B.

K_2HPO_4	120 g/L
KH_2PO_4	80 g/L

Além destas substâncias, o meio NFbHP contém 20 mM NH_4Cl (NFbHPN) e 50 $\mu\text{L/mL}$ de mistura de fosfatos. Para o meio sólido, o NFbHP foi acrescido de ágar 1,5% (m/v).

4.4. Reagentes e material de consumo

RNAase e tampões utilizados para preparar as soluções utilizadas na manipulação do DNA são todas de alto grau de pureza (grau biologia molecular) obtidas de diferentes fornecedores.

4.5. Gene *draB*

A análise da sequência que corresponde a *draB* de *A. brasilense* revelou que este gene possui códons raros para *E. coli*. Para contornar um possível problema de expressão, o gene *draB* foi sintetizado pela empresa IDT (Integrated DNA Technologies) com otimização de códons. A sequência sintetizada é mostrada abaixo:

```
AGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCCATATGGCGGACG
TGATCTTTTTGAAAAACCGGGCTGCGCAGGCAATAATCGCCA
GAAAGCGTTACTGGCGGAAGCGGGCCACACGGTACAAGCGC
GCGACCTGCTGTCAGAACCCTGGACCGCCGATCGCCTGCGT
CCCTTTTTTCGGTGATCGCCCCGTGCGAGAATGGTTCAACCGC
TCCGCTCCAGCGGTCAAAGCGGCGAGGTGGACCCAGATGC
GCTGGACGAAGCTGCAGCATTGGCTTTAATGCTGAAAACCCC
GCTGCTTATTCGCCGCCCTCTTATGCAGGTAGGGGACCGGC
GTGATTGTGGTTTCGAAGCCGAGCGTGTTGACGCCTGGATTG
GACTGGCAGCCGGAGCGCCCGAGGGCAAGCTGGAGGGCTG
CGCGCGGGCTGGCATGCCGCCGTGCCCGCCACCGGCGAAA
GGTTGAGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCT
```

As sequências dos códons de início e parada estão destacadas em vermelho, em negrito e sublinhado está destacado as sequências do sítio NdeI e BamHI e em itálico 5' upstream e 3' downstream, são as sequências que foram sintetizadas para clonagem por sobreposição de sequências (GIBSON *et al.*, 2009).

4.6. Preparo de células quimiocompetentes e transformação bacteriana

Um pré-inóculo de 3mL de *E. coli* TOP10 foi crescido sob agitação durante aproximadamente 16 h em meio LB. O inóculo foi feito a partir de 400 µL de pré-inóculo em 40 mL de meio LB, em frasco Erlenmeyer de 250 mL e crescido até atingir D.O 600 (densidade óptica a 600 nm) entre 0,4 e 0,6. A cultura de células foi centrifugada a 5000 rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. O *pellet* de células foi então ressuspenso em aproximadamente 12 mL de solução de MgCl₂ 100 mM gelada estéril, levando de 3 a 5 minutos para esse procedimento. As células foram novamente coletadas por centrifugação por 10 minutos a 4000 rpm e então o sobrenadante descartado. O *pellet* foi ressuspenso

em aproximadamente 5 mL de solução de CaCl_2 100 mM gelada estéril. Após a ressuspensão mais 25 mL de solução de CaCl_2 foi adicionada. Essa suspensão foi mantida em gelo por pelo menos 20 minutos e então novamente centrifugada por 10 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante foi descartado e ressuspenso em 1mL de solução de CaCl_2 100 mM em 15% de glicerol gelado estéril. As células foram divididas em alíquotas de 100 μL e estocadas a -80°C . Para transformação bacteriana, foi adicionado 3 μL de plasmídeo a 100 μL de célula competente, e a mistura incubada por 30 minutos no gelo. Em seguida foi realizado o choque térmico a 42°C por 45 segundos em banho-maria, adicionado 500 μL de LB e incubado por 30 minutos em estufa a 37°C . Posteriormente a mistura foi plaqueada em 25 mL de meio LA, contendo antibiótico, em seguida, foi incubada em estufa a 37°C por 16 horas.

4.7. Extração de DNA plasmidial

As colônias de bactérias foram crescidas em meio LB contendo antibiótico a 37°C sob agitação de 120 rpm por 16 horas. Para extração do DNA plasmidial, 1,5 mL de cultura foram centrifugados em tubos de polipropileno em microcentrífuga a 14500 rpm por 30 segundos. O sobrenadante foi ressuspenso em 200 μL de GET (50 mM glucose, 100 mM EDTA, 25Mm Tris- HCl Ph 8,0). Em seguida foi adicionado 200 μL de tampão lise (NaOH 0,2 M, SDS 1%), e a lise foi interrompida após poucos segundos pela adição de 200 μL de Kacf (Acetato de Potássio 3 M, Ácido fórmico 1,8 M). A suspensão resultante foi centrifugada por 5 minutos, o sobrenadante recuperado e a ele adicionado 200 μL de solução clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). A mistura foi homogeneizada e centrifugada por 5 minutos, e em seguida a fase aquosa transferida para um novo tubo. O DNA plasmidial foi precipitado pela adição de 0,6 vezes volumes de isopropanol, seguido de centrifugação por 10 minutos. Posteriormente o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com 1 mL de etanol 70%, centrifugado por 10 minutos a 14500 rpm, seco em estufa e ressuspenso em água estéril.

4.8. Desenho de oligonucleotídeos iniciadores (primers)

Os iniciadores foram desenhados utilizando como molde o gene *draB* sintético e genômico da estirpe sp245. Os sítios de restrição para enzima NdeI e BamHI foram introduzidos nas sequências dos primers. As temperaturas de anelamento foram calculadas com auxílio da ferramenta OligoAnalyzer (IDT)

(<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>).

TABELA 2 - SEQUÊNCIAS DOS PRIMERS UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DE *draB*. A sequência está marcada em cinza corresponde ao sítio NdeI e sequência em vermelho corresponde ao sítio de restrição da enzima BamHI.

Primers	Sequências	Tm (°C)
Foward	5' -CAGC CATATG GCGGACGTGATCT -3'	66,4
Reverse	5'GAATTC GGATCC TCAACCTTTGCGCG -3'	69,5
Foward	5'-CACAGC CATATG GCCGACGTGATCTTC- 3'	71,3
reverse	5'-GAATTC GGATCC TCACCCCTTTGCGG-3'	71,0

4.9. Obtenção e análise de sequências

A sequência de *draB* codificada na estirpe sp245 de *A.brasilense* foi encontrada com o auxílio do banco de dados GenBank do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). A sequência do genoma parcial de *A.brasilense* FP2 foi gentilmente cedida pelo grupo de fixação biológica de nitrogênio da Universidade Federal do Paraná. As sequências de DNA foram analisadas com o auxílio do programa MEGA7 (TAMURA *et al.*, 2016). Os alinhamentos de sequência de DNA foram realizados através da ferramenta Clustal ômega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) utilizando o algoritmo ClustalW.

4.10. Predição por homologia da estrutura terciária de DraB

As predições de estrutura terciária e modelamento foram feitos usando o programa Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>). A visualização dos modelos gerados e a sobreposição de estruturas foram feitas usando o programa PyMOL (<http://www.pymol.org/>).

4.11. Amplificação do gene *draB*

A reação em cadeia da polimerase (PCR) incluiu: Tampão HF buffer(5x), mistura de dNTP 0,2 mM, 1 µM de cada primer e Pfu DNA-Polimerase 2 U/µL para uma reação com volume final de 20 µL.

O programa de amplificação do DNA utilizado para amplificar *draB*, a partir DNA genômico da estirpe de *A. brasilense* FP2, incluiu 95 °C por 5 minutos para desnaturação inicial, seguidos por 10 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos, 45 °C por 15 segundos para o anelamento dos primers, extensão a 72 °C por 15 segundos. Posteriormente realizou-se 25 ciclos de desnaturação a

95°C por 15 segundos, 60°C por 15 segundos para o anelamento dos primers, e extensão a 72°C por 15 segundos. Um último ciclo de 72 °C por 5 minutos para extensão final.

O programa de amplificação do DNA utilizado para amplificar *draB*, a partir DNA genômico da estirpe de *A. brasilense* sp245 incluiu, 98°C por 1,5 minutos para desnaturação inicial, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 98°C por 10 segundos, 55°C por 30 segundos para o anelamento dos primers, e extensão a 72°C por 30 segundos. Um último ciclo de 72°C por 10 minutos foi realizado para extensão final.

4.12. Clonagem

Duas alternativas de clonagem foram testadas para a clonagem do gene *draB* amplificado. Na primeira o gene *draB* amplificado e vetor de expressão pET28a foram cortados com as enzimas de restrição NdeI e BamHI de acordo com as orientações do fabricante (Thermo Scientific). A reação foi mantida na estufa 37°C por 24 horas, findas as quais as enzimas foram inativadas por desnaturação a 85°C por 15 minutos. O fragmento digerido foi ligado ao vetor pET28a, e a ligação foi transformada em *E.coli* TOP10. As bactérias foram inoculadas em 25 mL de meio LA contendo canamicina na concentração final de 50 µg/mL, e em seguida incubadas em estufa a 37°C por 16 horas.

Na segunda clonagem, o vetor pBluescript II KS (+) foi cortado com a enzima SmaI, que produz pontas cegas. A reação de ligação de *draB* não digerido a pBluescript II KS (+) cortado foi realizada em um sistema de 10 µL e incluiu 0,2 µL do vetor, 1 µL de *draB* amplificado, 1 µL de Buffer T4 DNA ligase (1x), 0,5 µL de T4 DNA ligase e 0,5 µL de SmaI. A reação foi mantida a 4°C por 16 horas e em seguida foi transformada em *E. coli* estirpe TOP10. As bactérias foram inoculadas em 25 mL de meio LA, contendo ampicilina na concentração final de 40 µg/ML e X-gal na concentração final de 60µg/mL. Por fim, as culturas foram incubadas em estufa a 37°C por 16 horas.

4.13. Eletroforese de DNA

Os fragmentos de DNA foram analisados por eletroforese em gel de agarose (1%) (m/v) em tampão BE (borato de sódio 5mM; EDTA 0,5 mM). As

amostras foram aplicadas no gel e submetidas a 40 V por 1 hora e 30 minutos; em seguida, o gel foi incubado com brometo de etídeo 0,002%, e visualizado sob luz UVC (254 nm).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise de sequências

A sequência de DNA que corresponde a *draB* de *A. brasilense* sp245 foi comparada com a sequência do genoma parcial de *A. brasilense* FP2, através do alinhamento de sequências utilizando o algoritmo ClustalW (FIGURA 4).

A porcentagem da sequência submetida no programa coberta pelo alinhamento foi de 92% e a identidade entre as sequências foi de 96%. Portanto, há diferenças nas sequências de *draB* de *A. brasilense* FP2 e sp245. Para confirmar se haveria diferenças na composição dos aminoácidos de DraB entre as estirpes FP2 e sp245, foi realizado um alinhamento dessas sequências de aminoácidos (FIGURA 5). No alinhamento entre as sequências de aminoácidos foram encontrados 8 aminoácidos diferentes entre a *A. brasilense* FP2 e sp245. Diferenças de aminoácidos entre duas sequências podem acarretar em diferenças na estrutura e função da proteína. Como exemplo, a variante de Hemoglobina (Hb) S que aparece devido a uma mudança de ácido glutâmico para valina, na posição seis da cadeia β - globina. Essa proteína apresenta diferenças na estabilidade e solubilidade e, quando está na forma oxigenada, ocorre a polimerização de sua estrutura, assim causando endurecimento da membrana eritrocitária (PAULING *et al.*, 1949; COUTO *et al.*, 2014). Em contrapartida, diferenças de aminoácidos entre duas sequências podem não acarretar em mudança de estrutura e função da proteína, como por exemplo, a variante de Hemoglobina (Hb) E-Saskatoon que é ocasionada pela mudança de ácido glutâmico para lisina na posição 63, cadeia β -globina. Essa substituição resulta em uma mudança na carga molecular sem afetar a estabilidade, solubilidade ou função (IGARASHI *et al.*, 2007; COUTO *et al.*, 2014).

FIGURA 4- ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIA DO GENE QUE CODIFICA PARA PROTEÍNA DraB DE *A. brasilense* ESTIRPES FP2 E SP245. Os códons de início de tradução estão indicados em azul e os códons de para estão indicados em vermelho. A região onde se alinham os primers desenhados para este estudo estão sublinhadas em vermelho.

```

draB_sp245      -----TTCGACCATGSCCGACGTGATCTT
draB_FP2        TGCTCGCCCGCGCCCCGGCGCTCAAGCAGGGGTGACCGCGACCATGSCCGACGTGATCTT
                  *****

draB_sp245      CTTGAAAAGCCCGGCTGCGCCGGCAACAACCGCCAGAAGGCCCTGCTGGCGGAGGCCGG
draB_FP2        CTTGAAAAGCCCGGCTGCGCCGGCAACAATCGCCAGAAGGCCCTGCTGGCGGAGGCCGG
                  *****

draB_sp245      GCACACCGTCCAGGCCCGCGACCTGCTGTCCGAGCCCTGGACGGCGGACCGCTGCGCCC
draB_FP2        GCACACCGTCCAGGCCCGCGACCTGCTGTCCGAGCCCTGGACGGCGGACCGCTGCGCTC
                  *****

draB_sp245      CTTCTTCGGCGACCGCCCGGTGGCGAGTGGTTCAACCGAAGCGCCCCGGCGGTGAAGAG
draB_FP2        CTTCTTCGGCGACCGTCCCGGTGGCGAGTGGTTCAACCGCGCCCGCCGGCGGTGAAGAG
                  *****

draB_sp245      CGGGGAGGTCTGATCCGGACGCTCTGGACGAGGCCGCCCTGGCGCTGATGCTCAAGAC
draB_FP2        CGGGGAGGTCTGATCCGGACGCGCTGGACGAGGCTGCGGCCCTGGCGCTGATGCTGAGGAC
                  *****

draB_sp245      TCCGCTGCTGATCCGCCGTCCGCTGATGCAGGTGGGCGACCGCCGCGACTGCGGCTTCGA
draB_FP2        GCCGCTGCTGATCCGCCGTCCGCTGATGCAGGTGGGTGACCGCCGCGACTGCGGCTTCGA
                  *****

draB_sp245      GGCGGAGCGGGTGGACGCTGGATCGGGCTGGCCGCGGGGCGCCGGAGGGCAAGCTGGA
draB_FP2        GGCGGAGCGGGTGGACGCTGGATCGGGCTGGCCGCGGGAGCGCCGGAGGGCAAGCTGGA
                  *****

draB_sp245      AGGTGCGCCCGCGCCGGGATGCCGCCCTGCCACCACCCGCAAAGGGGTGACGGGACAA
draB_FP2        AGGTGCGCCCGCGCCGGGATGCCGCCCTGCCACCACCAAGACAACCGATTGACGATT
                  *****

draB_sp245      CCCGGACT-----
draB_FP2        TTGCTGCTCCGTTGGAGGACAAGAACCACACGGATTTCACGGATCAAAGCCGGATTTC
                  **

draB_sp245      -----
draB_FP2        CGGAATCCGCCGGATCGGCGCATGTGGCCTTACGTTGCGCATCCCGCATCGGACGGTTC

```

FIGURA 5- ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS QUE CORRESPONDEM A PROTEÍNA DraB DE *A. brasilense* ESTIRPES FP2 E SP245.

```

draB_FP2        MADVIFFEKPGCAGNNRQKALLAEAGHTVHARDLLSEPWTADRLRSFFGDRPVAEWFNRA
draB_sp245      MADVIFFEKPGCAGNNRQKALLAEAGHTVQARDLLSEPWTADRLRPFFGDRPVAEWFNRS
                  *****;*****

draB_FP2        APAVKSGEVPDALDEAAALALMLRTPLLIRRPLMQVGDRDCGFEAERVDWIGLAAGA
draB_sp245      APAVKSGEVPDALDEAAALALMLKTPLLIRRPLMQVGDRDCGFEAERVDWIGLAAGA
                  *****;*****

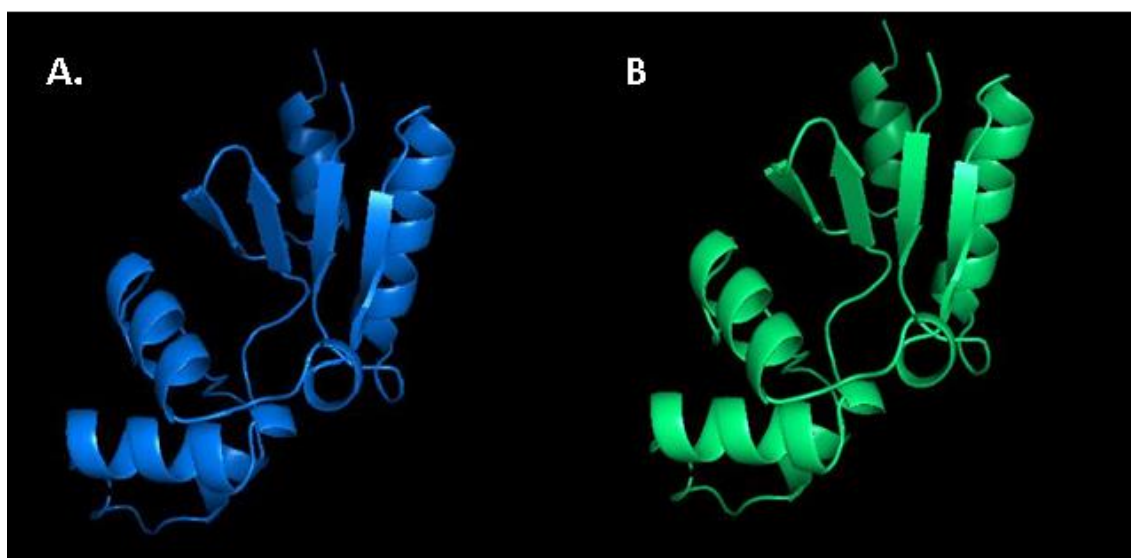
draB_FP2        PEGKLEGCARAGMPPCPPKTTD
draB_sp245      PEGKLEGCARAGMPPCPPPAKG-
                  *****

```

5.2. Predição por homologia da estrutura terciária de DraB

Utilizando a plataforma Phyre2, foi possível fazer a predição de estrutura tridimensional e o modelamento da proteína. O programa encontrou como melhor proteína-molde para o modelamento de DraB uma Arsenato redutase (*arsC*) de *Brucella melitensis*, cujo o número de acesso ao PDB é Bm-YffB ou 2kok. Elas possuem 23% de identidade, sendo que 81% da sequência de DraB foi modelado com 100% de confiança. A visualização dos modelos foi feita através do PyMOL (FIGURA 6).

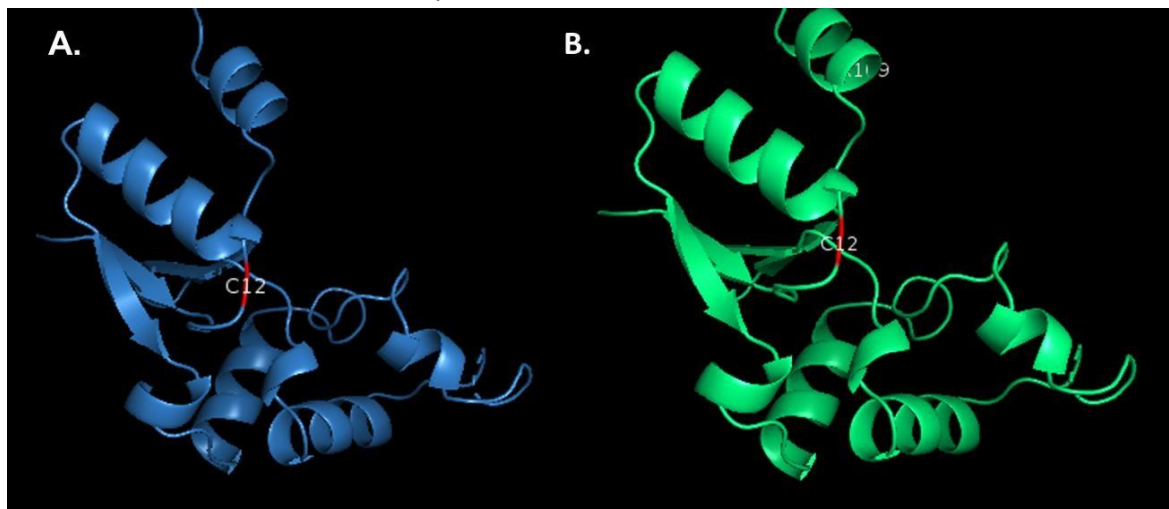
FIGURA 6- PREDIÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DE DraB UTILIZANDO OS SERVIDORES PHYRE2 E PYMOL. A. DraB de *A. brasilense* sp245. B. DraB de *A. brasilense* FP2.



A arsenato redutase de *B. melitensis* possui em sua estrutura dois domínios: uma folha mista de quatro cadeias flanqueadas por uma série de hélices que formam uma dobra geral. Essa proteína converte arsenato (H_2AsO_4), um composto tóxico para bactérias, a arsenito (AsO_2), produto que pode ser exportado eficientemente para fora da célula (BUCHKO *et al.*, 2011). A estrutura de ArsC de *E. coli* é semelhante à de *B. melitensis*, mas diferem em seu sítio catalítico. ArsC de *E. coli* possui em seu sítio catalítico um resíduo de cisteína (Cys-12) intercalado por três resíduos de arginina (Arg-107, Arg-94 e Arg- 60) (MARTIN *et al.*, 2001), enquanto na estrutura de ArsC de *B. melitensis* essa tríade de resíduos de arginina está ausente, e essa proteína pode ser capaz de ligar glutathiona na ausência de arsenato (BUCHKO *et al.*, 2011). DraB de *A.*

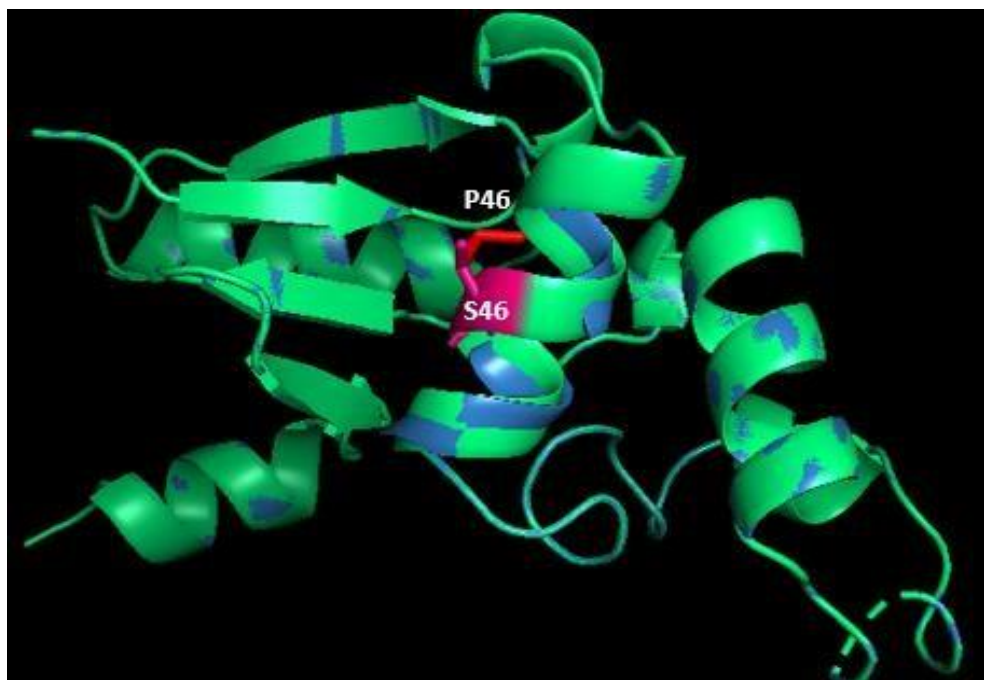
brasile sp245 e *A. brasili* FP2, não possuem em sua estrutura essa tríade de arginina, sendo encontrado apenas o resíduo catalítico Cys-12 (FIGURA 7), o que sugere uma possível diferença na especificidade do substrato.

FIGURA 7- MODELO DE ESTRUTURA TERCIÁRIA DE DRAB INDICANDO O RESÍDUO CATALÍTICO CYS-12. A. DraB de *A. brasili* sp245. B. DraB de *A. brasili* FP2.



Como DraB de *A. brasili* FP2 e sp245 diferem na composição aminoacídica, foi realizado uma sobreposição de estruturas através do programa PyMOL. Não foi observado diferenças significativas entre os modelos estruturais; no entanto, a troca do serina por prolina no resíduo 46 deve ser destacada, pois a presença de prolina na hélice, pode levar à desestabilização da mesma (FIGURA 8). A prolina possui uma cadeia lateral alifática ligada covalentemente a um átomo de nitrogênio, o que restringe marcadamente a faixa angular da molécula; além disso, prolina pode adotar facilmente a configuração trans ou cis dependendo da carga local. Essas características excepcionais explicam a tendência de prolina ser excluída de α -hélices e β -folhas sendo situadas apenas nas extremidades desses motivos. Isso ocorre porque a prolina interrompe a estrutura secundária da proteína, inibindo a conformação α -hélice e β -folha (MORGAN E RUBENSTEIN, 2013).

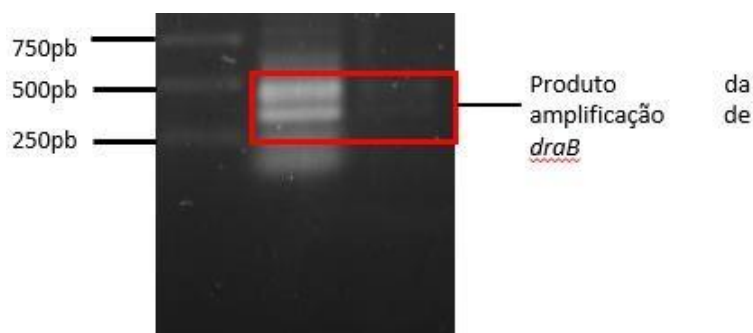
FIGURA 8- SOBREPOSIÇÃO DAS ESTRUTURAS TRIDIMENSIONAIS DE DRAB DE *A.brasilense* FP2 E SP245. O alinhamento dos modelos foi realizado através do PyMOL. DraB de *A. brasilense* FP2 está colorida em verde e DraB de *A. brasilense* sp245 está em azul. O resíduo Pro-46 de *A. brasilense* sp245 está indicado em vermelho, e o resíduo de Ser-46 de *A.brasilense* FP2 está indicado em rosa.



5.3. Amplificação do gene *draB*

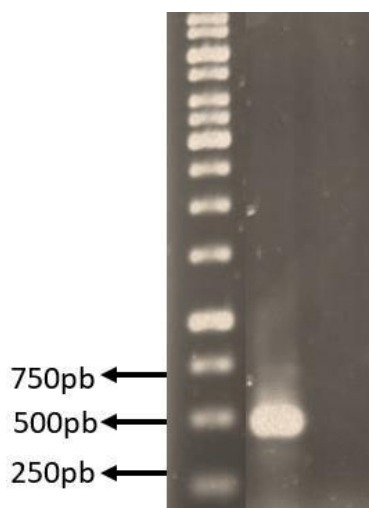
Após consideráveis tentativas, sem sucesso, de clonagem do gene *draB* sintético, primers foram construídos para amplificação de *draB* a partir do DNA genômico de *Azospirillum brasilense* (TABELA 2). O DNA molde utilizado para as reações de PCR foi o DNA genômico de *A. brasilense* FP2. Tentativas iniciais de amplificação utilizando *Taq* DNA polimerase foram realizadas, mas não foi obtido êxito, a despeito de diversas tentativas de otimização do protocolo. Como alternativa, a reação passou a ser realizada utilizando *Pfu* DNA polimerase (FIGURA 9).

FIGURA 9- PCR DO GENE DRAB A PARTIR NO GENOMA DE A. BRASILENSE FP2. A linha 1 está o marcador molecular 1Kb. Linha 2 e 3 produtos da PCR.



O tamanho esperado do fragmento é de 432pb. Bandas inespecíficas foram observadas na corrida eletroforética, portanto bandas que possuíam entre 400- 500pb foram extraídas e purificadas do gel de agarose (1%). Uma tentativa de clonagem desses fragmentos no pET28a após restrição com NdeI e BamHI foi mal-sucedida. Uma análise posterior da sequência de *draB* em *A. brasiliense* FP2 revelou o primer reverse desenhado não se alinha perfeitamente à sequência do gene, devido a diferenças na porção C-terminal da sequência (FIGURA 4). Como alternativa foi feito uma PCR utilizando o DNA genômico da estirpe sp245 de *A. brasiliense* como molde e um produto de aproximadamente 500pb foi amplificado (FIGURA 10).

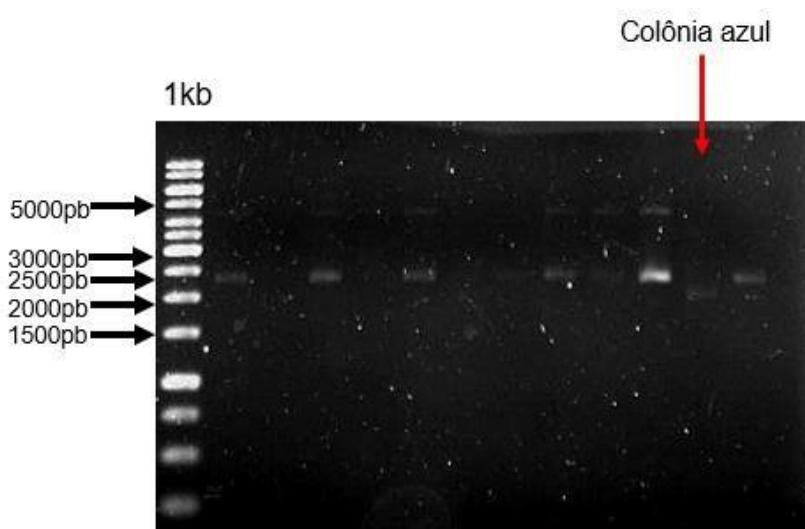
FIGURA 10- PCR DO GENE DraB A PARTIR NO GENOMA DE *A. brasiliense* SP245. A linha 1 contém o marcador molecular 1Kb. Linha 2- *draB*.



5.4. Clonagem

O produto da PCR realizada a partir do DNA genômico *A. brasilense* sp245 foi ligado diretamente ao vetor pBluescript II KS (+) digerido com SmaI e transformando em *E. coli* estirpe TOP10. A seleção das colônias com inserto foi realizada com a adição de X-gal às placas de LA. Foi extraído o DNA plasmidial das colônias brancas que cresceram após 16 horas de incubação (FIGURA 11).

FIGURA 11-EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL. A linha um corresponde a 1 Kb ladder. As demais linhas correspondem aos plasmídeos das colônias brancas. Exceto a linha 11 que corresponde aos plasmídeos obtidos a partir de uma colônia azul.



Para confirmar se o inserto foi inserido no plasmídeo foi feita uma restrição desse DNA plasmidial, com as enzimas NdeI e BamHI. O resultado esperado era o aparecimento de um fragmento de aproximadamente 428pb, mas até o momento nenhum clone foi confirmado.

6. CONCLUSÃO

- Há diferenças entre as sequências de *draB* de *A. brasilense* FP2 e sp245;
- Há diferenças na composição aminoacídica de *draB* de *A. brasilense* FP2 e sp245, mas as estruturas terciárias dessas proteínas são possivelmente similares;
- Apesar de *draB* possuir uma alta similaridade com *arsC* de *E. coli*, as duas proteínas possuem sítios catalíticos diferentes, e possivelmente se associam a

diferentes substratos;

- Foi possível amplificar *draB* a partir do DNA genômico de *A. brasilense* sp245;
- Novas tentativas de clonagem de *draB* de *A. brasilense* sp245 devem ser realizadas;
- Novas tentativas de amplificação de *draB* de *A. brasilense* FP2 e clonagem devem ser realizadas.
- Novas tentativas de amplificação e clonagem de *draB* com códons otimizados devem ser realizadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASGHAR, H; ZAHIR, Z; ARSHAD, M; KHALIQ, A. **Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth- promoting activities in Brassica juncea L.** Biology and Fertility of Soils, v. 35, n. 4, p. 231-237, 2002.

BUCHKO, G, W; HEWTT, S, N; NAPULI, A, J; VAN VOORHIS, W, C; MYLER, P, J. **Solution structure of an arsenate reductase-related protein, YffB, from *Brucella melitensis*, the etiological agent responsible for brucellosis.** Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications, v. 67, p. 1129-1136, 2011.

BURRIS, R, H. **Nitrogenases.** The Journal of Biological Chemistry, v. 266, n. 15, p. 9339-9342, 1991.

CANFIELD, D, E; GLAZER, A, N; FALKOWSKI, P, G. **The Evolution and Future of Earth's Nitrogen Cycle.** Science, v. 330, p. 192-196, 2010.

CARR, P, D; CHEAH, E; SUFFOLK, P, M; VASUDEVAN, S, G; DIXON, N, E; OLLIS, D, L. **X-Ray structure of the signal transduction protein PII from *Escherichia coli* at 1,9 Å.** Acta Crystallographica, v. 52, p. 93-104, 1996.

COUTO, G, K; LORENZINI, P, F; PILGER, D, A; AZEVEDO, L, A; WEBER, C; MACEDO, J, L; DIEDRICH, V; DE CASTRO, S, M. **Association of hemoglobina E-saskatoon with Hemoglobin S: Report of the first case found in Brazil.** Acta Haematologica, v. 131, p. 84-87, 2014.

DE ZAMAROCZY, M; DELORME, F; ELMERICK, C. **Characterization of three different nitrogen-regulated promotor regions for the expression of *glnB* and *glnA* in *Azospirillum brasilense*.** Molecular Genetics and Genomics, v. 224, p. 421-430, 1990.

DE ZAMAROCZY, M; PAQUELIN, A; PELTRE, G; FORCHHAMMER, K; ELMERICH, C. **Coexistence of two structurally similar but functionally different PII proteins in *Azospirillum brasilense*.** Journal of Bacteriology, v. 178, n. 14, p. 4143-4149, 1996.

DIXON, R; KAHN, D. **Genetic regulation of biological nitrogen fixation.** Nature Reviews in Microbiology, v. 2, p. 624-634, 2004.

FORCHHAMMER, K. **PII signal transducers: novel functional and structural insights.** Trends in Microbiology, v. 16, n. 2, p. 65-72, 2008.

GRUBER, N; GALLOWAY, J, N. **An earth-system perspective of the global nitrogen cycle.** Nature, v. 451, p. 293-296, 2008.

HERRIDGE, D, F; PEOPLES, M, B; BODDEY, R, M. **Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems.** Plant and Soil, v. 311, p. 1-18, 2008.

HUERGO, L, F; MERRICK, M; PEDROSA FO, CHUBATSU, LS, ARAUJO, L, M, SOUZA, E, M. **Ternary complex formation between AmtB, GlnZ and nitrogenase regulatory enzyme DraG reveals a novel facet of nitrogen regulation in bacteria.** Molecular Microbiology, v. 66, n. 6, p. 1523-1535, 2007.

HUERGO, L, F; MERRICK, M; MONTEIRO, R, A; CHUBATSU, L, S; STEFEENS, M, B, R; PEDROSA, F, O; SOUZA, E, M. **In Vitro Interactions between the PII Proteins and the Nitrogenase Regulatory Enzymes Dinitrogenase Reductase ADP-ribosyltransferase (DraT) and Dinitrogenase Reductase-activating Glycohydrolase (DraG) in *Azospirillum brasilense*.** The Journal of Biological Chemistry, v. 264, n. 11, p. 6674-6682, 2009.

HUERGO, L, F; PEDROSA, F, O; MULLER-SANTOS, M; CHUBATSU, L, S; MONTEIRO, R, A; MERRICK, M; SOUZA, E, M. **PII signal transduction proteins: pivotal players in post- translational controlo f nitrogenase activity.** Microbiology Research, v. 158, n. 1, p. 179-190, 2012.

HUERGO, L, F; SOUZE, E, M; STEFFENS, M, B; YATES, M, G; PEDROSA, F, O; CHUBATSU, L, S. **Effects of over-expression of the regulatory enzymes DraT and DraG on the ammonium- dependente post-translational regulation of nitrogenase reductase in *Azospirillum brasilense*.** Archives of Microbiology, v. 183, n. 3, p. 209-217, 2005.

HUERGO, L, F; SOUZA, M, E; ARAUJO, M, S; PEDROSA, F, O; CHUBATSU, L, S; STEFFENS, M, B, R; MERRICK, M. **ADP-ribosylation of dinitrogenase reductase in *Azospirillum brasilense* Is regulated by AmtB-dependent membrane sequestration of DraG.** Molecular Microbiology, v. 59, n. 1, p. 326-337, 2006.

HUNGRIA. M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: Inovação em rendimento a baixo custo.** Documentos/ Embrapa Soja, ISSN 1516-781X; n. 325, p.36, 2011.

IGARASHI, Y; MATSUZAKI, S; KANOU, N; INAMI, S; NAKAMURA, T; KASAI, K; FUSHITANI, K. **The first e of Hb E- Saskatoon [$\alpha 2\beta 222(B4)$ Glu→Lys] in A Japanese Male In Asia.** v. 19, p. 403-406, 2009.

JAVELLE, A; SEVERI, E; THORNTON, J; MERRICK, M. **Ammonium sensing in *Escherichia coli*.** The Journal of Biological Chemistry, v. 279; n. 10; p. 8530-8538, 2004.

JAVELLE, A; THOMAS, G; MARINI, A; KRÄMER, R; MERRICK, M. **In vivo functional characterization of the *Escherichia coli* ammonium channel AmtB: evidence for metabolic coupling of AmtB to glutamine synthetase.** Biochemical Journal, v. 390, p. 215-222, 2005.

KELLEY, L, A; MEZULIS, S; YATES, C, M; WASS, M, N; STERNBERG, M, J. **The phyre2 web portal for protein modeling prediction and analysis.** Nature protocols, v. 10, p. 845-858, 2015.

KHADEMI, S; O'CONNELL, J; REMIS, J; ROBLES-COLMENARES, Y; MIERCKE, J, W; STROUDT, R, M. **Mechanism of Ammonia Transport by Amt/MEP/Rh: Structure of AmtB at 1,35 Å.** Science, v. 305, p. 1586- 1594, 2004.

KHAMMAS, K, M; AGECON, E; GRIMONT, P, A; KAISER, P. ***Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen- fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil.** Microbiology Research, v. 140, n. 9, p. 679-93, 1989.

KLASSEN, G; SOUZA, E, M; YATES, M, G; RIGO, L, U; COSTA, R, M; INABA, J; PEDROSA, F, O. **Nitrogenase switch-off by ammonium ions in *Azospirillum brasilense* requires the glnB nitrogen signal- transducing protein.** Applied and Environmental Microbiology, v. 71, n. 9, p. 5637-5641, 2005.

KLEINER, D. **Bacterial ammonium transport.** FEMS Microbiology Reviews, v. 32, p.87-100, 1985.

LANZILOTTA, W, N; SEEFELDT, L, C. **Changes in the midpoint potentials of nitrogenase metal centers as a result of iron protein- Molybdenum- Iron protein complex formation.** Biochemistry, v. 36, p. 12976-12983, 1997.

LIANG, J. H.; NIELSEN, G. M.; LIES, D. P; BURRIS, R. H.; ROBERTS, G. P.; LUDDEN, P. W. **Mutation in the *draT* and *drag* genes of *Rhodospirillum rubrum* result in loss of regulation of nitrogenase by reversible ADP-ribosylation.** Journal of Bacteriology, v. 173, p. 6903-6909, 1991.

LOWERY, R, G; LUDDEN, P, W. **Effect of nucleotides on the activity of dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase from *Rhodospirillum rubrum*.** Biochemistry, v. 28, p. 4956-4961, 1989.

MACHADO, H. B; FUNAYAMA, S; RIGO, L, U; PEDROSA, F, O. **Excretion of ammonium by *Azospirillum brasilense* mutants resistant to ethylenediamine.** Canadian Journal of Microbiology, v. 37, n. 7, p. 549–553, 1991.

MAGALHÃES, F, M, M. **Nitrogen fixing bacteria isolated from diverse soils and grass roots in Amazônia.** In VOSE, P & RUSCHEL, A.P., eds. Associative N₂ – Fixation. New York, CRC Press, p. 39-48, 1981.

MARTIN, P; DEMEL, S; SHI, J; GLADYSHEVA, T; GATTI, D, L; ROSEN, B, P;

EDWARDS, B, F, P. **Insights into structure, solvation and mechanism of ArsC arsenate reductase a novel arsenic detoxification enzyme.** Structure, v. 9, p. 1071-1081, 2001.

MOREIRA, F, M, S; SILVA, K; NÓBREGA, R, S, A; CARVALHO, F. **Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia, e potencial de aplicações.** Comunicata Scientiae, v. 1, p. 74-99, 2010.

MORGAN, A, A; RUBENSTEIN, E. **Proline: the distribution, frequency, positioning, common functional roles of proline and polyproline sequences in the human proteome.** PLOS ONE, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2013.

MERRICK, M. **Post- translational modification of PII signal transduction proteins.** Frontiers in Microbiology, v. 5, n. 763, p. 1-6, 2015.

MERRICK, M, J; EDWARDS, R, A. **Nitrogen Control in Bacteria.** Microbiological Reviews; v. 59, n. 4, p. 604- 622, 1995.

MOURE, V, R; COSTA, F, F; CRUZ, L, M; PEDROSA, F, O; SOUZA, E, M; LI, X; WINKLER, F; HUERGO, L, F. **Regulation of nitrogenase by reversible mono-ADP-ribosylation.** Current Topics in Microbiology and Immunology, v. 384, p. 89-106, 2015.

MOURE, V, R; DANYAL, K; YANG, Z; WENDROTH, S; MÜLLER-SANTOS, M; PEDROSA, F, O; GERHARDT, E, C, M; HUERGO, F, O; SOUZA, E,M; SEEFELDT, L, C. **The nitrogenase regulatory enzyme dinitrogenase reductase ADP- ribosyltransferase (DraT) is activated by direct interaction with the signal transduction protein GlnB.** Journal of Bacteriology, v.195, n. 2, p. 279-286, 2013.

NINFA, A, J; ATKINSON, R, M. **PII signal transduction proteins.** Trends in Microbiology, v. 8, n. 4, p. 172-179, 2000.

NINFA, A, J; JIANG, P. **PII signal transduction proteins: sensors of α -ketoglutarate that regulate nitrogen metabolism.** Current Opinion in Microbiology, v. 8, n. 2, p. 168-173, 2005.

OLIVARES, F, L; JAMES, E, K; BALDANI, J, I; DÖBEREINER, J. **Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the**

endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. New Phytologist Trust, v. 135, n. 4, p. 723-737, 1997.

ORHAN, E; ESITKEN, A; ERCISLI, S; TURAN, M; SAHIN, F. **Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry**. Scientia Horticulturae, v. 111, n. 1, p. 38-43, 2006.

OWCZARZY, R; TATAUROV, A, V; WU, Y; MANTHEY, J, A; MCQUISTEN, K, A; ALMABRAZI, H, G; PEDERSEN, K, F; LIN, Y; GARRETSON, J; MCENTAGGART, N, O; SAILOR, C, A; DAWSON, R, B; PEEK, A, S. **IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers**. Nucleic Acids Research, v. 36, p.163-169, 2008.

PEDROSA, F, O; YATES, M, G. **Regulatory of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nifA* and *ntr (gln)* type gene products**. FEMS Microbiology letters, v.23, n. 1, p. 95-101, 1984.

PÉREZ-MONTAÑO, F; ALÍAS-VILLEGAS, C; BELLGÍN, R, A; DEL CERRO, P; ESPUNY, M, R; GUERRERO-JIMÉNES, I; LÓPEZ-BAENA, F, J; CUBO, T. **Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production**. Microbiology Research, v. 169, p. 325-336, 2014.

PAULING, L; ITANO, H, A; SINGER, S, J; WELLS, I, C. **Sickle cell anemia, a molecular disease**. Science. v. 110, p. 543-548, 1949.

RAYMOND, J; SIEFERT, J, L; STAPLES, C, R; BLANKENSHIP, R, E. **The natural history of nitrogen fixation**. Molecular Biology and Evolution, v. 21, n. 3, p. 541- 554, 2004.

REINHOLD, B; HUREK, T; FENDRIK, I; POT, B; GILLIS, M; KERTERS, K; THIELEMANS, S; DE LEY, J. ***Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a Nitrogen-Fixing organismo associated with roots of kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth**. International Journal of Systematic Bacteriology, v. 37, n. 1, p. 43-51, 1987.

RUBEL, T, E; RAITTZ, R, B; COIMBRA, N, A; GEHLEN, M, A, C; PEDROSA, F,

O. ProCiaT, a new bioinformatics tool for *in silico* protein reclassification: case study of DraB, a protein coded from the *draTGB* operon in *Azospirillum brasilense*. BMC Bioinformatics, v. 18, p. 1-10 ,2016.

SAARI, L, L; TRIPLETT, E, W; LUDDEN, P, W. **Purification and properties of the activating enzyme for iron protein of nitrogenase from photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum***. The Journal of Biological Chemistry, v. 259, n. 24, p. 15502-15508, 1984.

SAARI, L, L.; POPE, M, R; MURREL, S, A; LUDDEN, P, W. **Studies on the activating enzyme for iron protein of nitrogenase from *Rhodospirillum rubrum***. The Journal of Biological Chemistry, v. 261, n.11, p. 4973-4977, 1986.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SIDDIQUI, Z, A. **PGPR: Biocontrol and Biofertilization**. Springer, 2006.

SIERVERS, F; WILM, A; DINEEN, D; GIBSON, T, J; KARPLUS, K; LI, W; LOPEZ, R; MCWILLIAM, H; REMMERT, M; SÖDING, J; THOMPSON, J, D; HIGGINS, D, G. **Fast scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega**. Molecular Systems Biology, v. 7, n. 539, p. 1-6, 2011.

STEENHOUDT, O; VANDERLEYDEN, J. ***Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects**. FEMS Microbiology, v. 24, p. 478-506, 2000.

TAMURA; STECHER; KUMAR. **MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets**, 2015.

TARRAND, J, J; KRIEG, N, R; DÖBEREINER, J. **A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. Nov.** Canadian Journal of Microbiology, v.24, n.8, p. 967-980, 1978.

WESTBY, C, A; ENDERLIN, C, S; STEINBERG, N, A; JOSEPH, C, M; MEEKS,

J, C. **Assimilation of NH_4^+ by *Azospirillum brasilense* grown under nitrogen limitation and excess.** Journal of Bacteriology, v. 169, n. 9, p. 4211-4214, 1987.

ZHANG, Y; BURRIS, R, H; LUDDEN, P, W; ROBERTS, P G. **Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*.** FEMS Microbiology letters, v. 152, p. 195-204, 1997.

ZHANG, Y; BURRIS, R, H; ROBERTS, G, P. **Cloning, sequencing, mutagenesis, and functional characterization of *draT* and *draG* genes from *Azospirillum brasilense*.** Journal of Bacteriology, v. 174, n. 10, p. 3364-3369, 1992.

ZHANG, Y; POHLMANN, L, E; HALBLEIB, C, M; LUDDEN, P, W; ROBERTS, G, O. **Effect of PII and Its Homolog GlnK on Reversible ADP- Ribosylation of Dinitrogenase Reductase by Heterologous Expression of the *Rhodospirillum rubrum* Dinitrogenase Reductase ADP-Ribosyl Transferase–Dinitrogenase Reductase-Activating Glycohydrolase Regulatory System in *Klebsiella pneumoniae*.** Journal of Bacteriology, v. 183, n. 5, p. 1610-1620, 2001.

